云 南 植 物 研 究 1989；11（4）：440—448
Acta Botanica Yunnanica

商陆种子抗病毒蛋白的制备及毒性分析

朱晓梅* 胡 忠
（中国科学院昆明植物研究所， 昆明）

摘要 采用一种改进的方法，从商陆属两种植物——商陆（*Phytolacca acinosa*）和美州商陆（*P. americana*）种子中分别制备抗病毒蛋白(Pokeweed antiviral protein from seeds，简称PAP-s)。研究证明，两种植物中的PAP-s性质完全相同。经SDS-PAGE和凝胶过滤层析测得该蛋白质为单一肽链，分子量约 30kD；聚丙烯酰胺等电聚焦电泳测得等电点为 8.4；经 Edman降解，测得N-末端氨基酸为Ile．PAP-s在兔网织红细胞裂解液中抑制蛋白质合成ID_{50}为 2.6ng/ml（8.6×10^{-11} mol/l）；将该蛋白质与脊髓灰质炎Ⅱ型病毒混合接种于猴肾细胞培养液，显示出较强的抗病毒活性，浓度为4.17×10^{-8} mol/l时能抑制98%的病毒增殖。将PAP-s通过异型双功能连接剂SPDP与抗人T细胞单克隆抗体Wu71偶联制备免疫毒素，对T淋巴细胞白血病CEM细胞显示特异杀伤作用，在10^{-9} mol/l时可杀灭76.4%的靶细胞，^{14}C-亮氨酸掺入蛋白质合成抑制试验显示ID_{50}为10^{-10}—10^{-9} mol/l。

关键词 商陆；美洲商陆；抗病毒蛋白；免疫毒素；白血病；脊髓灰质炎病毒

根据文献报道[1]，美洲商陆（*Phytolacca americana*）种子中含有一种单链的抗病毒蛋白〔Pokeweed antiviral protein from seeds，简称PAP-s (am)〕，进入动植物体细胞后，可使60s核糖体亚基失活，阻止蛋白质的生物合成，从而抑制病毒增殖。PAP-s的结构和作用方式与蓖麻毒素A链相似，在国外已被用于与单克隆抗体偶联，制备免疫毒素[2，3]。由于蓖麻毒蛋白是由A、B两条肽链构成的植物毒素，在制备免疫毒素时，必须将A链与B链拆开，以避免毒素与细胞表面的非特异性结合，而A、B链的分离十分困难，因此，不少人认为用PAP-s制备免疫毒素是更理想的材料[2]。迄今为止，国内尚未见这方面研究工作的报道。关于PAP-s在植物体中的生理意义及其在其他方面的应用尚待研究。

云南各地广泛分布着另一种商陆(*P. acinosa*)，其结籽率高，取材方便，如果这种商陆的种子中含有性质与PAP-s (am) 相同的抗病毒蛋白，则在免疫毒素制备中将会获得一个新的资源。基于此，我们分离鉴定了这种商陆种子中的抗病毒蛋白成分，简称PAP-s(ac)，并与PAP-s(am)作了比较。

本文报告两种商陆种子抗病毒蛋白的分离、特性及其在免疫毒素中的应用。

1988-08-17收稿

* 昆明植物所八九届硕士研究生

材 料 和 方 法

1.材　料

供提取蛋白的材料是我所引种栽培的商陆（*Phytolacca acinosa*）和美洲商陆（*P. americana*）种子。秋季采摘上述两种植物成熟果实，剥离出种子，洗净阴干后保存在－15°C冰箱中。

2.蛋白质的制备

参照Barbieri等人的方法[1]，作了较大的改进，步骤如下：

提取：取上述任一种植物的种子400克，粉粹后用蒸馏水于4°C下搅拌提取8小时，以10^4xg离心去除残渣，收集上清液。

分离酸性蛋白和碱性蛋白：将上清液通过CM-sephadex A-50柱（φ 4 ×15cm），用平衡缓冲液（5 mM，pH 7.0 PB）冲洗柱内不吸附的酸性蛋白和杂质，然后用含0.6mol/l NaCl的磷酸钠盐缓冲液（5 mM，pH 8.0）洗脱吸附在基质上的碱性蛋白，收集流出液，超滤浓缩。

纯化：采用Sephadex G-50（fine）柱（φ2.5×47cm）纯化碱性蛋白浓缩液，用含0.05mol/l NaCl的PBS（5 mM，pH7.0）平衡洗脱，280nm波长检测，得到二个洗脱峰，收集峰1组分（G1）。将G1在CM-纤维素（52）柱（φ 2 ×12cm）上进一步梯度洗脱纯化，洗脱液为含0—0.5 mol/l NaCl的PBS（5 mM，pH7.0），得到组分C。将该组分用PM 10超滤脱盐和浓缩，冻干成蛋白干粉。

3.蛋白质理化及免疫学性质的测定

按常规SDS-PAGE测定蛋白质的分子量，胶浓度15%，Laemmli缓冲系统[4]。同时，用Sephacryl s-200（Pharmacia产品）凝胶过滤层析法测定蛋白质分子量，胶柱用含0.1mol/l NaCl的5 mM磷酸钠盐缓冲液（pH7.0）平衡和洗脱。

按盘状聚丙烯酰胺聚焦电泳法测定蛋白质的等电点[5]，胶浓度5.25%，采用LKB公司的两性载体电解质（Ampholine，pH 3.5—9.5）。

蛋白质的氨基酸组成分析按常规法，在6 *N* HCl中于110°C水解24h，用日立835型氨基酸自动分析仪测定。采用Edman降解法得到PTH-氨基酸[6]，经反相高压液相柱层析鉴定，确定N-末端氨基酸。

将提纯的PAP-s(am)溶于生理盐水（1 mg/ml），加入等量福氏完全佐剂混匀给家兔作皮下注射，剂量为1 mg/kg，以后每隔一日用不完全佐剂混合加强一次，共两次，最后一次注射不加佐剂的PAP-s(am)溶液。检测抗体滴度后制备兔抗PAP-s(am)抗血清，按常规方法作琼脂免疫双扩散试验。

4.蛋白质生物活性的检测

采用蚀斑抑制法检测蛋白质的抗病毒活性[7，8]。用爱尔氏液稀释Ⅱ型脊髓灰质炎病毒（中Ⅱ 2—2，85，3）至－4 log，分别加入100、10、1、0.1μg PAP-s混合，使病毒终浓度为－5 log，即100 PFU/ml，病毒对照为－5 log。取猴肾细胞用PBS洗1—2次，将蛋白和Ⅱ型病毒的混合液接种于致密单层细胞上，37°C吸附30分钟后覆盖

蚀斑营养液，避光于37°C培养，7天后观察蚀斑形成数目，作定量分析。

参照Maniatis 等人的方法[9]，建立一个可用于分析蛋白质毒力的兔网织红细胞蛋白质合成体系。将不同浓度的PAP-s 加入到90μl含有^{3}H-亮氨酸的体系中，于37°C反应1小时，分别取5μl反应液点样在Whatman Ⅲ号滤纸片上，按申庆祥等人的方法[10]处理，用二甲苯闪烁液进行液闪计数。

5.免疫毒素的制备及其生物学活性

参照Ramakrishnan等人的方法[2]，以PAP-s作为毒素，采用N-琥珀酰胺-3-(2-二硫吡啶)丙酸(SPDP)异型双功能连接剂，与抗人T细胞单克隆抗体Wu71(CD_5，卫生部武汉生物制品研究所史良如教授惠赠)合成免疫毒素Wu71:PAP-s。我们在实验中使用过量的PAP-s，以保证偶联反应后不存在游离单抗，最后将反应混合物通过Sephadex G-75柱层析，去除多余的自由PAP-s，这与Ramakrishnan等人报道的用Sephacryl s-200分离有所不同。用前述的电泳缓冲系统，经SDS-PAGE鉴定毒素与单抗的交联。以免疫双扩散法检测偶联前后的抗原性。偶联物Wu71:PAP-s的生物学活性通过细胞毒作用和完整细胞中^{14}C-亮氨酸掺入蛋白质合成抑制试验检测[11]。

结　果

1.抗病毒蛋白的制备

自400g商陆或美洲商陆种子的稀盐抽提液经CM-sephadex A-50分离后，得到碱性蛋白约1g，再过Sephadex G-50得到二个组分(图1)，其中G1含有PAP-s。将G1通过CM-cellulose柱层析所得的主要组分C（图2）便是纯化的抗病毒蛋白，冰冻干燥约得240mg干粉，经电泳鉴定达到电泳纯，蛋白质得率约0.06%。

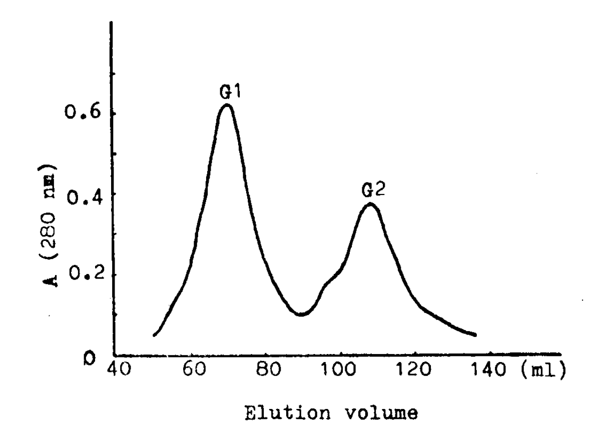


图1　商陆种子碱性蛋白在Sephadex G-50凝胶柱上的层析图，组分G1含PAP-s

Fig. 1 Gel filtration of the alkaline protein of pokeweed seeds on Sephadex G-50 column. Fraction G1 contains PAP-s.

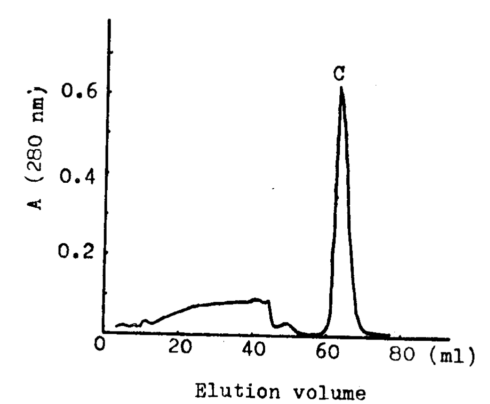


图2　组分G1在CM-cellulose柱上的离子交换层析，组分C为PAP-s

Fig.2 Ion exchange chromatography of fraction G1 on CM-cellulose. Fraction C is PAP-s. Fractions were eluted with a 0—0.5 mol/l NaCl gradient.

2.抗病毒蛋白的特性

SDS-PAGE（图 3）测得PAP-s(am)和PAP-s(ac)的分子量均为 30kD，这与凝胶过滤层析结果一致，PAP-s 的洗脱体积位于 Ovalbumin (45 kD) 和Chrymotrypsinogen A(25 kD) 之间而靠近后者（表 1）。

PAP-s(am)和PAP-s(ac)均为碱性蛋白，等电点8.4(图 4）。

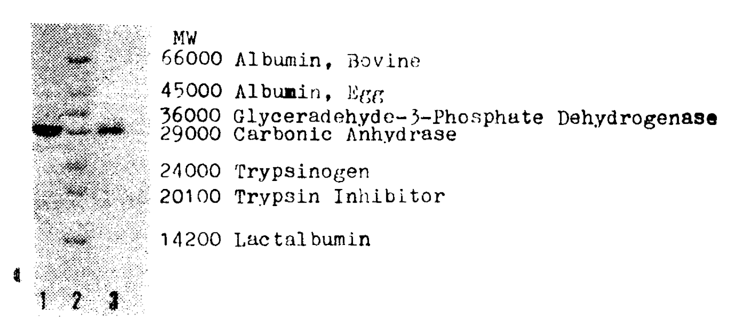


图 3　SDS-PAGE测定PAP-s(am)和PAP-s(ac)的分子量

Fig. 3 Determination of molecular weight of PAP-s(am) and PAP-s (ac) in SDS-PAGE. 1, PAP-s(am); 2, Standard proteins; 3, PAP-s(ac).

表 1　Sephacryl s-200凝胶过滤法测定分子量

Table 1 Elution volume and Kav of different proteins in Sephacryl S-200 column

Protein	Ve(ml)	MW	Kav*
BSA	27.6	67000	0.284
Ovalbumin	30	45000	0.359
Chrymotrypsinogen A	33.5	25000	0.469
Ribonuclease A	36	13700	0.547
PAP-s	31.5	30000	0.406

* $Kav = \frac{Ve - Vo}{Vt - Vo}$

Ve = Elution volume of sample

Vo = Elution volume of Blue dextran = 18.5 ml

Vt = Bed volume

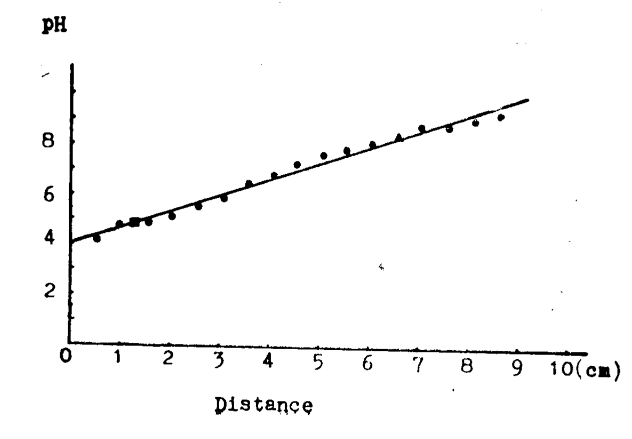


图 4　用等电聚焦法测定蛋白质的等电点

Fig. 4 Isoelectric focusing of PAP-s in gel rods. Standard protein: BSA (■pI 4.8). pI of PAP-s is 8.4(▲).

由表2，PAP-s(am)和PAP-s(ac)的氨基酸组成相近，富含Asp、Lys，与文献[1]报道的PAP-s氨基酸组成一致。由Edman降解法分析N-末端氨基酸，高压液相柱层析结果显示，PAP-s(am)和PAP-s(ac)的N-末端氨基酸均为Ile，结果与文献报道一致[12]。

用兔PAP-s(am)抗血清与PAP-s(ac)PAP-s(am)进行琼脂免疫扩散，表明PAP-s(am) PAP-s(ac)可发生交叉反应，其抗原性与PAP-s(am)一致（图5左）。

表2 PAP-s(am)和PAP-s(ac)的氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of PAP-s(am) and PAP-s(ac)

Amino acid	PAP-s(am)	PAP-s(ac)
Asx	26.7(27)	26.5(27)
Thr	12.7(13)	16.6(17)
Ser	13.3(13)	10.5(11)
Glx	21.3(21)	21.3(21)
Gly	27.2(27)	23.5(24)
Ala	12.9(13)	3.1(13)
Cys	2.0(2)	2.0(2)
Val	11.5(12)	12.8(13)
Met	4.7(5)	4.5(5)
Ile	13.7(14)	14.4(14)
Leu	18.6(19)	19.4(19)
Tyr	8.7(9)	9.4(9)
Phe	6.5(7)	6.5(7)
Lys	17.5(18)	18.2(18)
His	2.0(2)	2.2(2)
Arg	8.7(9)	8.7(9)
Pro	11.1(11)	11.2(11)
Total	223	223

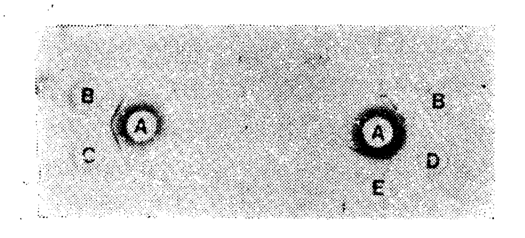


图5 PAP-s及Wu71:PAP-s的免疫双扩散

Fig. 5 Immunodiffusion of PAP-s and Wu71:PAP-s

A. Rabbit anti-PAP-s(am)serum

B. PAP-s(am)

C. PAP-s(ac)

D. Wu71:PAP-s(am)

E. Wu71:PAP-s(ac).

3.抗病毒蛋白的生物学活性

PAP-s(am)和PAP-s(ac)均有很强的抗病毒作用，显示在4.17×10^{-8} mol/l能抑制98%病毒增殖，二者的作用强度相同（表3）。

表3 PAP-s(am)和PAP-s(ac)对脊髓灰质炎病毒的蚀斑抑制作用

Table 3 Plaque inhibition of poliovirus multiplication by PAP-s(am) and PAP-s(ac)

	Content of PAP-s (mol/l)	Plaque number	log	PFU*/ml	Inhibition (%)
PAP-s(ac)	4.17×10^{-8}	0	<5.0	1.0×10^{5}	>98
	4.17×10^{-9}	2	6.0	1.0×10^{6}	83
	4.17×10^{-10}	3	6.18	1.5×10^{6}	75
	4.17×10^{-11}	4	6.30	2.0×10^{6}	66
PAP-s(am)	4.17×10^{-8}	0	<5.0	1.0×10^{5}	>98
	4.17×10^{-9}	1	5.7	5.01×10^{5}	90
	4.17×10^{-10}	2	6.0	1.0×10^{6}	83
	4.17×10^{-11}	4	6.3	2.0×10^{6}	66
Virus control		12	6.78	6.03×10^{6}	
Cell control		0		0	

* PFU = Plaque-forming units

PAP-s(am)和PAP-s(ac) 抑制无细胞蛋白质合成的 ID_{50} 为 2.6ng/ml(8.6×10^{-11} mol/l)，与文献[1]报道的1.1ng/ml(3.6×10^{-11} mol/l)相近（表 4）

表 4　PAP-s在兔网织红细胞裂解液中对蛋白质合成的抑制作用

Table 4 Inhibition of protein synthesis by PAP-s in a rabbit reticulocyte lysate

	Protein content (mol/l)	CPM	Incorporated-fold	ID_{50} (mol/l)
Control	0	138240	54	
PAP-s (am)	1.12×10^{-10}	46080	18	8.36×10^{-11}
PAP-s (ac)	1.14×10^{-10}	51200	20	8.91×10^{-11}

CPM before reacting = 2560

$$\text{Incorporated-fold} = \frac{\text{CPM}}{\text{CPM before reacting}}$$

以上结果表明，PAP-s(am) 和 PAP-s(ac) 均具有强抗病毒作用，在无细胞蛋白质合成体系中，能强烈地抑制蛋白质的生物合成。

4.免疫毒素的特性及其特异杀伤作用

抗人T细胞单抗Wu71与PAP-s 用 SPDP 连接成的免疫毒素 Wu71:PAP-s，经SDS-PAGE鉴定，显示Wu71:PAP-s结合物区带上既可看到单抗的区带，也可看到PAP-s的区带（图 6）。

用兔抗PAP-s 抗血清与 Wu71:PAP-s 结合物及游离PAP-s进行琼脂免疫双扩散，显示结合物中含有PAP-s, 其抗原性与游离 PAP-s 完全一致（图 5，右）。

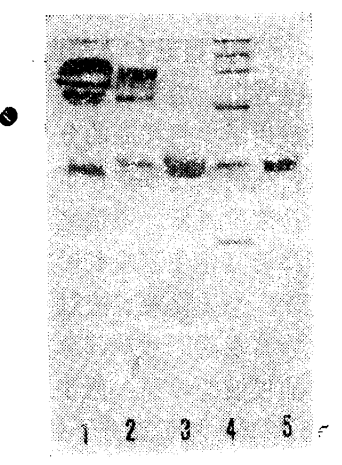


图 6　免疫毒素的 SDS-PAGE

Fig. 6 SDS-PAGE of immunotoxin made with Wu71 and PAP-s. 1. Wu71; 2. Wu71:PAP-s conjugate; 3. PAP-s(am); 4. Standard proteins; 5. PAP-s(ac).

细胞毒试验表明，游离 PAP-s 在 10^{-9} mol/l 浓度以下对白血病细胞无明显抑制作用，浓度为10^{-8} mol/l 时则可杀伤约10%的细胞，这对CEM细胞和阴性细胞（SP2/0）结果均相似。游离Wu71 在 10^{-9} mol/l 对细胞的杀伤作用低于 4 %，相同浓度的Wu71:PAP-s结合物72小时可杀伤76.4%的CEM细胞，而SP2/0细胞仅被杀灭 7 %，说明Wu71与PAP-s连接后对CEM细胞有明显的特异杀灭作用（图 7）。

完整细胞中^{14}C-亮氨酸掺入蛋白质合成抑制试验结果见图 8，显示Wu71:PAP-s在 10^{-9} mol/l 时对蛋白质的抑制作用为72.4%，在10^{-10} mol/l 时为42.4%，ID_{50} 为$10^{-10}-10^{-9}$ mol/l。

上述结果表明，二种来源的PAP-s均可制作免疫毒素，偶联物活性相同。

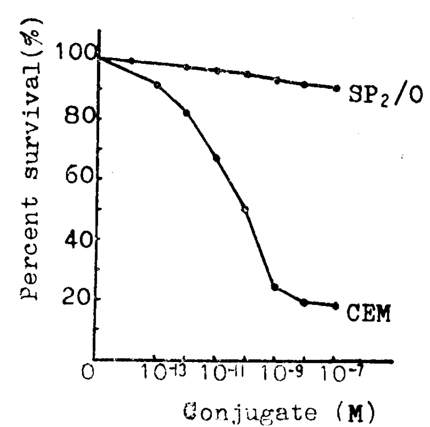


图7　免疫毒素对CEM细胞的细胞毒作用

Fig. 7 Cytotoxicty of Wu71:PAP-s on CEM and SP2/0 cells

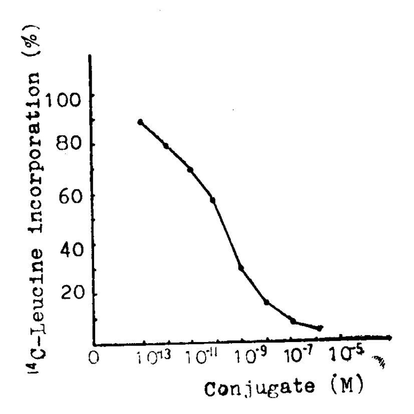


图8　免疫毒素抑制CEM细胞的蛋白质合成

Fig. 8 Protein synthesis inhibition of CEM cell lines by Wu71:PAP-s

讨　论

1.商陆种子抗病毒蛋白的制备

Barbieri等人报道[1]美洲商陆（*Phytolacca americana*）的分离方法是：先用稀盐溶液抽提蛋白，透析后经羧甲基纤维素柱层析分离纯化。此法较为简便，但实验证明，它仅适用于少量样品的分离，而在大量制备时，这种方法通常达不到纯化的水平。因此，我们在制备过程中作了较大的改进：①种子粉粹后，以蒸馏水抽提蛋白，这样的抽提液中盐浓度极低，提取完毕不需要透析去盐就可上柱分离，省去了透析这一耗费时间的过程，而且避免了在长时间的透析过程中，可能发生的酶解反应，保证蛋白质不致被降解变性。②抽提液直接过CM-sephadex A-50柱层析，除去酸性蛋白和其它杂质，再用盐溶液将吸附的碱性部分洗脱下来。这种做法的优点在于：减少提取液中的蛋白成份，缩小抽提液的体积，便于进一步纯化。③将碱性蛋白过Sephadex G-50分离，除去等电点与PAP-s相近而分子量小于30kD的蛋白质。由于碱性部分中蛋白成份较少，这一过程的洗脱峰清晰，而且得到的蛋白质溶液含盐较少，可直接上CM-纤维素柱层析纯化。运用改进后的分离方法，在大量制备样品时，提高了纯度，减少了损失。

2.PAP-s(am)与PAP-s(ac)的比较

我们以在云南分布较广的商陆（*P. acinosa*）种子为材料，制备了一种抗病毒蛋白PAP-s(ac)，其分子量，等电点，氨基酸组成和N-末端氨基酸等理化性质均与PAP-s(am)相同；其抗病毒作用、细胞毒作用，对体外和体内蛋白质合成的抑制作用等生物学活性也与PAP-s(am)一致。实验显示，PAP-s(am) PAP-s(ac)对兔抗PAP-s(am)抗血清均发生免疫交叉反应，具有共同的抗原性。因此，以商陆代替美洲商陆提取PAP-s制备免疫毒素也是可行的。

Barbieri等人和Houston等人报道[1，2]，春季美洲商陆叶子抗病毒蛋白（PAP）、夏季美洲商陆叶子抗病毒蛋白（PAP-II）和美洲商陆种子抗病毒蛋白（PAP-s）它们的

分子量、等电点，氨基酸组成和 N-末端氨基酸均有差别，甚至抗原性也不一样。这就说明，在美洲商陆个体发育的不同阶段或在同一植物的不同器官中，抗病毒蛋白的性质存在明显的差异，而我们的实验表明商陆属（*Phytolacca*）二个不同种的种子中抗病毒蛋白性质完全相同。由此看出，商陆属植物种子中的抗病毒蛋白质在遗传学上有很强的稳定性，可作为商陆属植物的分类特征，在探讨植物亲缘关系上提供分类依据。

致谢：中国科学院上海细胞生物学研究所张尚权、谢弘老师协助建立体外蛋白质合成系统；中国医学科学院昆明医学生物学研究所张枫、张和君老师协助作病毒蚀斑抑制试验；同济医科大学博士研究生褚嘉佑同志协助作免疫毒素制备和细胞毒试验；昆明植物所刘小烛同志协助作末端氨基酸分析。

参 考 文 献

1 Barbieri L, Aron G M, Trvin J D et al. *Biochem J* 1982; **203**:55—59

2 Ramakrishnan S, Houston L L. *Cancer Research* 1984; **44**:201—208

3 Stirpe F, Barbieri L. *FEBS LETTERS* 1986; **195**: 1 — 8

4 Laemmli U K. *Nature* 1970; **227**:680—685

5 刘培楠，梁植汉，宋振玉等．仪器分析及其在分子生物学中的应用（第三册）．北京：科学出版社，1978:330—347

6 中国科学院上海有机化学研究所天花粉小组．有机化学 1982; **4**:310

7 Irvin J D. *Pharmac Ther* 1983; **21**:371—387

8 Duggar B M, Armstrong J K. *Ann Mo Bot Gard* 1925; **12**:359—366

9 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *MOLECULAR CLONING* a laboratory manual. USA; Cold Spring Harbor Laboatory, 1982:171

10 申庆祥，郭礼和．实验生物学报 1984; **17**:193—198

11 褚嘉佑，杨爱德，王辨明等．同济医科大学学报 1989; **18**:147—151

12 Houston L L, Ramakrishnan S, Hermodsom M A. *The Journal of Biological Chemistry* 1983; **258**:9601—9604

PREPARATION OF THE ANTIVIRAL PROTEIN FROM POKEWEED SEEDS AND ASSAY OF ITS TOXICITY

Zhu Xiaomei, Hu Zhong

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming)

Abstract By an improved procedure, pokeweed antiviral protein (PAP-s) has been prepared from seeds of *Phytolacca americana* and *P. acinosa* respectively. Our experiment demonstrated that the characters of PAP-s from both two species were all the same. The protein is a single peptide chain with MW 30,000 and pI 8.4 determined by SDS-PAGE and eletrofocusing on Ampholine/polycrylamide-gel plates. Edman degradation showed that N-terminal residue of PAP-s was Ile. PAP-s inhibits protein synthesis in a rabbit reticulocyte lysate with an ID_{50} of 2.6 ng/ml (8.6×10^{-11} mol/l). The multiplication of poliomyclity virus type I in monkey kidney cells infected in the presence of the protein is strongly inhibited, a 98% inhibition being caused by it at a concentration of 4.17×10^{-8} mol/l. PAP-s has been conjugated to monoclonal antibody Wu71 to from immunotoxin specifically toxic to T-lymphocyte leukemia CEM cells. At a concentration of 10^{-9} mol/l, 76.4% target cells are killed, compared to 10% at 10^{-9} mol/l of free PAP-s. 50% protein synthesis is inhibited by conjugate Wu71:PAP-s at $10^{-10}-10^{-9}$ mol/l, determined with ^{14}C-Leu incorporation.

Key words *Phytolacca acinosa*; *P. americana*; Antiviral protein; Immunotoxin; Leukemia; Polyomyclity virus